

**PEROMBAKAN SENYAWA HIDROKARBON AROMATIS POLISIKLIK
(NAFTALEN) PADA KADAR TINGGI OLEH *Pseudomonas* NY-1
(*Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (Naphthalene) at High
Concentration by Pseudomonas NY-1*)**

Yanisworo Wijayaratih

Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian UPN "Veteran", Yogyakarta

Abstrak

Naftalen merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik (HAP) yang banyak dijumpai dalam minyak bumi, batu bara dan hasil alam lainnya. Meskipun bukan senyawa xenobiotik, naftalen dapat menjadi persoalan yang serius karena penggunaannya yang luas dan penanganan yang tidak hati-hati. Naftalen diketahui bersifat mutagenik. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri yang dapat merombak naftalen dan mempelajari kemampuannya merombak naftalen kadar tinggi dalam medium mineral (MM) cair. Tanah yang tercemari minyak bumi dan sumber isolat diperoleh dari unit pengolahan minyak Pertamina, Cilacap. Isolat diperoleh melalui kultur diperkaya menggunakan naftalen. Jumlah naftalen yang ditambahkan ke dalam MM cair sebesar 907, 1362 dan 1813 ppm. Inkubasi dilakukan selama 28 hari dalam keadaan gelap. Parameter yang diamati meliputi: jumlah sel hidup dengan metode *drop plate* dan kadar naftalen sisa dengan menggunakan GC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri yang dipilih, teridentifikasi sebagai *Pseudomonas* NY-1. Dalam MM cair, naftalen pada semua konsentrasi terombak pada kecepatan yang mirip. Jumlah naftalen yang terombak adalah 777,3 ppm, 728,6 ppm dan 837,2 ppm, dari konsentrasi awal berturut-turut sebesar 907, 1362, dan 1813 ppm.

Abstract

Naphthalene is one of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), found in petroleum, coal and other natural products. Although, it is nonxenobiotic, it could cause a serious problem when improperly used and handled. It is considered as a mutagenic compound. This study is primarily concerned with the isolation of bacteria that could utilize naphthalene and the investigation of its biodegradation ability of naphthalene in high concentration in liquid mineral media (MM). The contaminated soil and isolates were obtained from oil treatment unit, Pertamina, Cilacap. Bacterial isolation was conducted through enriched culture. Naphthalene was added to the liquid MM at the concentration of 907, 1362, and 1813 ppm. The culture was incubated in the dark for 28 days. Parameters examined were: the viable cells which was measured by drop plate method and naphthalene residues which was analyzed using GC. The result showed that the isolated bacteria was identified as Pseudomonas NY-1. The naphthalene at all concentrations were degraded at relatively similar speed. The amount of naphthalene degraded were: 777.3 ppm, 728.6 ppm and 837.2 ppm for the initial concentration of 907 ppm, 1362 ppm, and 1813 ppm, respectively.

I. PENDAHULUAN

Naftalen merupakan hidrokarbon aromatis polisiklik (HAP) yang terdiri atas dua cincin benzen. Dalam kadar tertentu, naftalen menghambat respirasi pada mitokondria sehingga mengakibatkan terhambatnya konsumsi oksigen pada beberapa organisme (Heitkamp *et al.*, 1987). Karena merupakan derivat dari cincin benzen, maka senyawa HAP mempunyai energi resonansi yang tinggi. Hal ini mengakibatkannya pada kondisi alami bersifat stabil dan persisten (Novak *et al.*, 1995). Sumber utama HAP adalah minyak bumi, batu bara, dan industri pengawetan kayu. Di alam, naftalen terdapat dalam bentuk campuran dengan senyawa HAP lainnya.

Pencemaran oleh senyawa HAP perlu mendapat perhatian mengingat penggunaannya yang luas dan pelepasannya di alam yang tinggi akibat penanganannya yang kurang hati-hati. Beberapa peneliti menunjukkan bahwa kadar HAP total sekitar 2000 ppm (mg/kg) sudah menimbulkan pencemaran (Kilbane II, 1998; Meyer & Hans, 2001). Bahkan Murygina *et al.*, (2000) menganggap bahwa kadar minyak bumi di perairan sebesar 400 ppm sudah bersifat mencemari lingkungan. Tergantung pada sumber pencemarnya, kadar naftalen dalam HAP berkisar antara 5% dan 50% (Kilbane II, 1998; Meyer & Hans, 2001; Kirchman & Ewnetu, 1998).

Naftalen sangat sesuai digunakan sebagai model untuk mempelajari perombakan senyawa HAP. Hal ini karena naftalen merupakan HAP yang paling sederhana sehingga paling mudah larut dan mudah terombak. Di samping itu, sistem enzim perombak naftalen diketahui berfungsi sebagai mediasi pada perombakan senyawa HAP lainnya, seperti fenantren, antrasen dan fluoren (Ahn *et al.*, 1999).

Meskipun pada umumnya mikroorganisme hanya dapat menggunakan senyawa HAP dalam bentuk terlarut (Thomas *et al.*, 1986; Tiehm & Fritzsche, 1995; Volkerling *et al.*, 1992), tetapi beberapa peneliti menunjukan bahwa mikroorganisme juga dapat merombaknya dalam bentuk tidak terlarut (Yoshida & Yamane *cit.* Thomas *et al.*, 1986; Zilber *et al.*, 1980). Pemahaman tentang mekanisme atau karakter suatu jasad dalam merombak senyawa sukar terlarut sangat penting. Hal ini karena pada sistem perlakuan limbah, atau bahkan dalam ekosistem alami, pada umumnya kontaminan HAP terdapat dalam kadar yang lebih tinggi daripada nilai kelarutannya dalam air.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang dapat merombak naftalen dan mempelajari kemampuannya dalam merombak naftalen pada kadar yang tinggi. Isolat yang diperoleh diharapkan di samping mampu merombak naftalen juga dapat merombak senyawa HAP lainnya sehingga dapat digunakan sebagai inokulan untuk bioremediasi lingkungan yang tercemari oleh senyawa HAP.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Senyawa HAP merupakan senyawa yang mempunyai struktur dasar berupa dua atau lebih cincin aromatis terkondensasi (benzen). Senyawa HAP banyak tersebar di alam sebagai kontaminan. Naftalen merupakan HAP yang paling sederhana, terdiri atas dua cincin benzen. Nilai kelarutannya dalam air sebesar 30,6 mg/l (Smith, 1994). Beberapa mikroorganisme diketahui dapat merombak naftalen. Di samping naftalen, mikroorganisme tertentu juga diketahui dapat merombak senyawa HAP lainnya seperti fenantren, antrasen (Santaverano *et al.*, 1993).

Beberapa faktor lingkungan mempengaruhi perombakan senyawa hidrokarbon. Pada umumnya, perombakan hidrokarbon secara efektif oleh mikroorganisme terjadi pada kondisi aerob sehingga ketersediaan oksigen merupakan faktor penentu. Di samping itu karena hidrokarbon merupakan senyawa yang

kaya akan karbon (C), tetapi sangat sedikit mengandung nitrogen (N) dan fosfor (P), maka N dan P tersebut harus ditambahkan.

Langkah awal perombakan hidrokarbon melibatkan pengikatan (kontak) substrat pada membran sitoplasma. Karena HAP merupakan senyawa hidrofobik, sedangkan mikroorganisme memerlukan lingkungan yang berbentuk cairan untuk tumbuh dan beraktivitas secara optimal, maka langkah selanjutnya adalah pelarutan HAP oleh surfaktan yang dihasilkan mikroorganisme. Selanjutnya adalah terjadinya transpor naftalen ke dalam sel secara enzimatik (Bossert & Compeau, 1995).

Naftalen dirombak oleh sejumlah enzim yang dikode oleh gen yang terdapat dalam plasmid, yang dikenal dengan NAH7. Bakteri pada awalnya akan mengoksidasi HAP menghasilkan dihidrodilol yang selanjutnya diubah menjadi senyawa hidroksi seperti katekol dan hidroksi mukonat, serta beberapa senyawa karboksilat (Grimm & Harwood, 1997; Mueller *et al.*, 1996). Sistem enzim perombak naftalen berfungsi sebagai mediasi pada perombakan senyawa HAP lainnya, seperti fenantren, antrasen dan fluoren (Ahn *et al.* 1999). Lebih lanjut Fought dan Westlake (1991), mengemukakan bahwa galur yang dapat menggunakan beberapa senyawa HAP mempunyai jenis enzim yang sama yang bertanggung jawab terhadap oksidasi senyawa HAP tersebut pada tahap tertentu.

Naftalen sebagai kontaminan di alam biasanya terdapat dalam bentuk campuran dengan senyawa HAP lainnya. Dalam perombakan senyawa berbentuk campuran, umumnya terjadi interaksi antar-substrat yang berupa penghambatan atau pemacuan. Bauer dan Capone (1988), mendapatkan bahwa pada endapan lumpur laut, pemaparan dengan benzen, fenantren dan antrasen meningkatkan perombakan naftalen, sedangkan keberadaan naftalen hanya meningkatkan perombakan fenantren. Namun, pada *Pseudomonas stutzeri* P-16 dan *P. saccharophila* P-15, naftalen, metilnaftalen dan fluoren menghambat secara

kompetitif terhadap perombakan fenantren (Stringfellow & Aitken, 1995).

Heitkamp dan Cerniglia (1988), berhasil mengisolasi bakteri yang dapat merombak naftalen, fenantren, fluoranten, dan piren, berturut-turut sebesar 60%, 50%, 90%, dan 63%. serta termineralisasi menjadi CO_2 . *Pseudomonas stutzeri* P-16 dan *P. saccharophila* P-15 yang diisolasi menggunakan media yang diperkaya dengan fenantren dapat menggunakan naftalen, metilnaftalen dan fenantren sebagai satu-satunya sumber substrat dan energi, sedangkan fluoren hanya dapat digunakan secara kometabolisme (Stringfellow & Aitken, 1995). Sansaverino *et al.* (1993), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa ketiga isolat galur *Pseudomonas* yang diuji masing-masing membawa plasmid yang mempunyai homologi tinggi dengan NAH7. Seperti halnya plasmid NAH7, ketiga plasmid tersebut juga membawa gen penyandi pembentukan enzim yang berperan dalam perombakan fenantren dan antrasen.

Peneliti lain, yaitu Whyte *et al.* (1997), menemukan galur *Pseudomonas* yang dapat merombak naftalen, alkana, dan toluen melalui enzim yang disandi oleh gen yang terdapat pada plasmid yang berbeda. Frederickson *et al.* (1991), mendapatkan isolat bakteri yang membawa dua plasmid (berukuran masing-masing sekitar 100 kb) dapat menggunakan toluen, naftalen, dibensotiopiren, suksinat, benzoat dan xilen sebagai sumber C dan energi. Perombakan naftalen oleh isolat tersebut diinduksi dengan adanya toluen.

III. CARA PENELITIAN

A. Isolasi Bakteri Perombak Naftalen

Tahap awal untuk mendapatkan isolat bakteri adalah dengan menginokulasikan sumber isolat ke dalam 25 ml Media Mineral (MM) Cair dalam Erlenmeyer 125 ml yang mengandung 341 ppm naftalen sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Sumber

isolat berasal dari unit pengolahan minyak Pertamina di Cilacap dan tanah yang tercemar minyak bumi. Dari media yang menunjukkan pertumbuhan bakteri diambil 2,5 ml untuk ditumbuhkan kembali pada 25 ml media yang sama. Pemindahan ke media yang baru dilakukan lagi sampai empat kali. Adapun komposisi (per l) media mineral yang digunakan adalah sebagai berikut (Smith *et al.*, 1997): 2 g Na_2HPO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,8 g K_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 64 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 64 mg ZnCl_2 , 40 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 40 mg H_3BO_3 , 32 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 32 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Isolasi dilakukan dengan menumbuhkan beberapa seri pengenceran kultur pada 10 ml MM padat dalam *petridish*. Seluruh permukaan media ditambah dengan naftalen sehingga mencapai kadar 341 ppm. Naftalen diambil dari stok pada kadar 52.000 ppm dalam aseton, dan diratakan pada permukaan media padat dalam *petridish* menggunakan drigalski. Isolasi dilakukan dengan metode goresan. Bakteri yang tumbuh dengan kenampakan morfologi koloni yang berbeda dipelihara dalam MM cair yang mengandung 341 ppm naftalen.

B. Seleksi dan Identifikasi

Seleksi dilakukan berdasarkan kecepatan pertumbuhan bakteri pada MM cair yang ditambah naftalen. Bakteri ditumbuhkan dalam 5 ml MM cair yang mengandung naftalen dalam tabung reaksi yang ditutup kapas (untuk menjaga agar suasana tetap aerob). Kadar naftalen divariasi dari 341 ppm, 682 ppm, 1362 ppm, 1813 ppm, sampai dengan 2724 ppm. Kadar naftalen ditentukan berdasarkan kebutuhan unsur karbon bagi mikroorganisme. Kadar naftalen tersebut setara dengan jumlah karbon yang terdapat dalam 0,3% glukose, yaitu sebesar 1362 ppm, kemudian divariasi terhadap kadar yang sudah ditentukan tersebut. Media diinokulasi dengan masing-masing isolat, hingga mencapai 10^6 sel/ml. Untuk penyiapan inokulum, bakteri ditumbuhkan pada MM padat yang permukaannya ditambah dengan naftalen, dibuat suspensi, kemudian

ditentukan kekeruhannya pada OD 578. Jumlah sel ditentukan berdasarkan kurva standar antara kekeruhan dan jumlah sel hidup yang sudah dibuat sebelumnya.

Bakteri lalu diinkubasikan selama 7 hari pada kondisi gelap, dengan penggojogan pada kecepatan 115 rpm, pada suhu 28°C. Jumlah bakteri ditentukan setiap 24 jam berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh pada permukaan media Nutrien Agar (*viable count*) menggunakan metode *drop plate* (Hoben & Somasegaran, 1982). Dalam metode ini media dalam *petridish* dibagi menjadi delapan sektor. Pada masing-masing sektor diteteskan 40 ul kultur dari tiap seri pengenceran, kemudian diinkubasikan selama 1 sampai 2 hari. Sebelum media digunakan, didiamkan terlebih dahulu paling tidak selama 2 hari pada suhu 28°C. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) ditentukan berdasarkan pertumbuhan sel pada fase logaritmik, menggunakan persamaan berikut (Pirt, 1975):

$$\mu = 2,30(\log x_t - \log x_0)/t \text{ jam}^{-1}$$
, dengan μ adalah kecepatan pertumbuhan spesifik, x_t adalah jumlah sel setelah inkubasi selama t jam, x_0 adalah jumlah sel awal, dan t adalah waktu inkubasi.

Isolat bakteri diseleksi berdasarkan kemampuan tumbuh. Isolat dengan kecepatan pertumbuhan spesifik yang tinggi digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Isolat terpilih diidentifikasi berdasarkan sifat morfologi dan biokimianya.

C. Pengujian Kemampuan Perombakan Naftalen dari Isolat Terpilih

Isolat yang mempunyai kecepatan pertumbuhan spesifik paling tinggi dipilih untuk diuji kemampuannya dalam merombak naftalen. Lima belas ml MM cair yang mengandung naftalen sebesar 907, 1362 dan 1813 ppm, masing-masing ditempatkan dalam tabung bervolume 75 ml. Masing-masing tabung diinokulasi dengan isolat bakteri hingga mencapai 10^6 sel/ml, kemudian diinkubasikan selama 28 hari pada suhu 28°C dalam inkubator

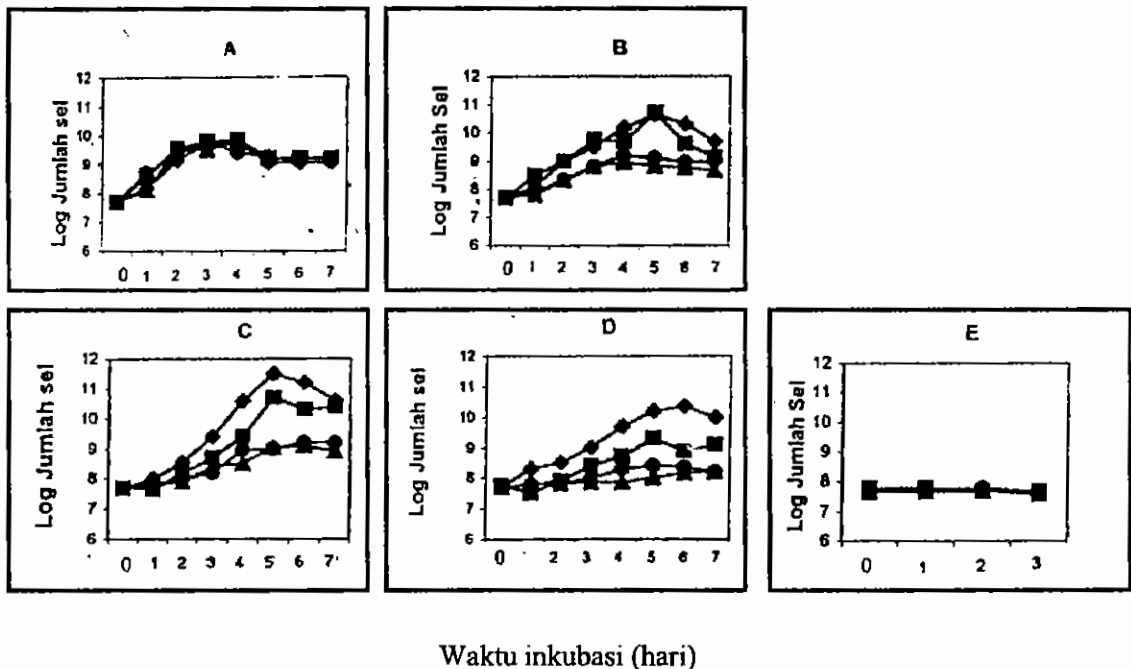
dengan penggojogan pada kecepatan 115 rpm. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari sampai inkubasi hari ke 10, kemudian pada hari ke 12, 14, 21 dan 28. Setiap hari tabung dibuka secukupnya secara aseptis untuk menjaga ketersediaan oksigen. Pengamatan dilakukan dengan tiga ulangan terhadap jumlah sel dan kadar naftalen dalam medium. Jumlah sel diamati dengan metode *drop plate* pada permukaan media Nutrien Agar (Hoben & Somasegaran, 1982). Sisa naftalen dalam kultur diekstrak menggunakan DCM dengan volume 1:1 (Whyte *et al.*, 1997), kemudian ditentukan kadarnya menggunakan GC yang dilengkapi dengan kolom SE 30 panjang 3 m, diameter luar kolom adalah 0,5 cm, diameter dalam 0,4 cm, dengan detektor berupa FID. Suhu kolom, detektor dan injeksi berturut-turut sebesar 200°C, 250°C dan 250°C, dan kecepatan aliran gas pembawa (N_2) adalah 35 ml/menit.

IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi

Isolat yang diperoleh dari tanah yang tercemari minyak bumi serta dari unit pengolahan minyak Cilacap, berturut-turut sebanyak 3 dan 4 isolat. Berdasarkan kecepatan pertumbuhan koloni, maka dari sumber isolat tanah tercemar diambil 2 isolat (NY-T1 dan NY-T2), sedangkan dari unit pengolahan minyak Cilacap 2 isolat (NY-1 dan NY-2). Seleksi berdasarkan kecepatan pertumbuhannya pada MM cair yang mengandung naftalen sebesar 341, 681, 1362, 1813, dan 2724 ppm (mg/kg) dapat dilihat pada Gambar 1.

Isolat NY-1 pada kadar naftalen yang lebih tinggi mempunyai kecepatan pertumbuhan spesifik yang lebih tinggi daripada isolat yang



Gambar 1. Pertumbuhan sel isolat NY-1 (◆), NY-2 (■), NY-T1 (Δ), dan NY-T2 (●) MM cair dengan kadar naftalen sebesar 341 ppm (A), 682 ppm (B), 1362 ppm (C), 1813 ppm (D), dan 2724 ppm (E).

lainnya (Tabel 1) sehingga untuk penelitian selanjutnya digunakan isolat NY-1. Jumlah sel isolat NY-1 yang tertinggi dicapai dalam waktu yang lebih cepat pada media dengan kadar naftalen yang lebih rendah dibandingkan dengan media dengan kadar naftalen yang lebih tinggi. Namun, jumlah sel paling tinggi dicapai pada media dengan kadar naftalen sebesar 1362 ppm. Pada media dengan kadar naftalen 341 ppm, jumlah sel maksimum adalah sebesar $6,31 \times 10^9$ sel/ml dicapai pada pengamatan hari ke 3, sedangkan pada media dengan kadar naftalen sebesar 681, 1362, dan 1813 ppm, jumlah sel maksimum berturut-turut sebesar $6,46 \times 10^{10}$ sel/ml, $2,45 \times 10^{11}$ sel/ml, $1,17 \times 10^{10}$ sel/ml, dicapai pada pengamatan hari ke 5, 5 dan 6 (gambar 1A, 1B, 1C dan 1D). Kecepatan pertumbuhan spesifik isolat NY-1, NY-T2, NY-1 dan NY-2 dalam MM cair dapat dilihat pada Tabel 1.

Isolat NY-T1, NY-T2, NY-1 dan NY-2 pada media dengan kadar naftalen sebesar 2724 ppm tidak mengalami pertumbuhan (Tabel 1). Pada kadar naftalen rendah (341 ppm), jumlah senyawa antara maupun energi yang dihasilkan tidak mencukupi untuk pertumbuhan sel yang lebih tinggi, sedangkan pada kadar naftalen yang tinggi (2724 ppm) sel mengalami keracunan sehingga tidak ada pertumbuhan.

Beberapa peneliti, masing-masing meng-

gunakan kadar naftalen yang berbeda-beda, yang berkisar antara 100 ppm dan 2000 ppm untuk mendapatkan aktivitas sel yang baik (Bauer & Capone, 1988, Frederickson *et al.*, 1991, Kastner & Mahro, 1996, Liu *et al.*, 1995, Stringfellow & Aitken, 1995, Whyte *et al.*, 1997).

Gambar 1 menunjukkan bahwa isolat NY-1 mempunyai kemampuan tumbuh yang lebih baik pada naftalen dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lainnya. Oleh sebab itu, maka isolat NY-1 dipilih untuk diamati lebih lanjut kemampuannya dalam merombak naftalen

Isolat NY-1 mempunyai sifat morfologi dan fisiologi sebagai berikut: bentuk sel batang ($3,7 \times 1,1$) mm, bentuk koloni bulat, gram negatif, katalase positif, nitrat reduktase negatif, metana bukan satu-satunya sumber C, tidak membutuhkan L-cystein dan faktor tumbuh dalam medium, tidak dapat tumbuh pada pH <4,5, tidak menghasilkan asam dari glukose, fruktose, sukrose dan galaktose, bersifat aerob, dan menimbulkan warna coklat pada MM cair yang mengandung senyawa aromatis, dalam hal ini naftalen. Sifat-sifat di atas sesuai dengan sifat bakteri genus *Pseudomonas* (Krieg & Holt, 1982), sehingga untuk selanjutnya isolat NY-1 disebut dengan isolat *Pseudomonas* NY-1.

Tabel 1. Kecepatan Pertumbuhan Spesifik Isolat NY-T1, NY-T2, NY-1 dan NY-2 pada MM Cair

Kadar naftalen awal Pada MM cair (ppm)	Kecepatan pertumbuhan spesifik (jam^{-1})			
	NY-1	NY-2	NY-T1	NY-T2
341	0,07	0,09	0,07	0,09
681	0,07	0,07	0,05	0,05
1362	0,08	0,07	0,05	0,05
2043	0,06	0,05	0,03	0,04
2724	0,00	0,07	0,00	0,00

B. Perombakan Naftalen dalam Media Mineral Cair oleh Isolat *Pseudomonas* NY-1

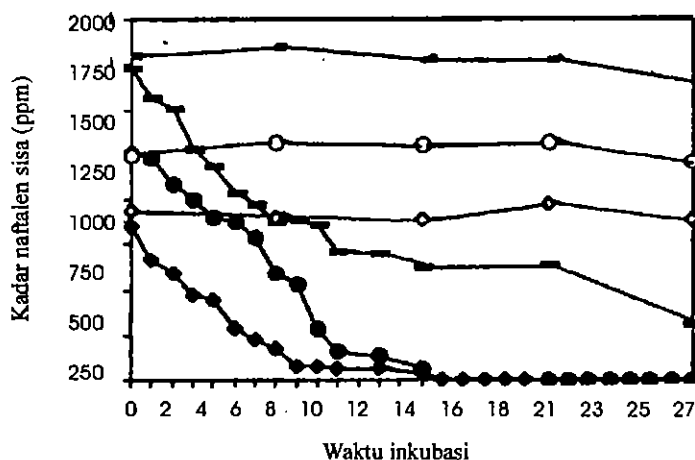
1. Perubahan kadar naftalen dalam MM cair

Meskipun kadar naftalen awal sudah diatur sebesar 907, 1362, dan 1813 ppm, tetapi setelah dilakukan ekstraksi, jumlah naftalen yang dapat diekstrak (% ekstraksi) dari media yang mengandung naftalen dengan kadar awal sebesar 907, 1362 dan 1813 berturut-turut adalah 854,4 ppm (94,2%), 1267 ppm (93,0%), dan 1725,6 ppm (95,1%). Perubahan kadar naftalen sisa dan perombakan naftalen oleh isolat bakteri pada MM cair dapat dilihat pada Gambar 2.

Pola perombakan naftalen dalam ketiga macam konsentrasi mirip, yaitu naftalen terombak dengan segera. Pada umumnya, fase *lag* dicapai kurang dari 24 jam. Sampai inkubasi 8 hari, pada media dengan kadar naftalen awal sebesar 907 ppm, naftalen terombak sebesar 772,3 ppm, yaitu dari 854,4 ppm pada awal inkubasi menjadi 77,1 ppm.

Pada media dengan kadar naftalen awal sebesar 1362 dan 1813 ppm, naftalen terombak sebesar 728,6 ppm dan 837,2 ppm, yaitu dari 1263,9 ppm pada awal inkubasi menjadi 535,3 ppm dan dari 1725,6 ppm pada awal inkubasi menjadi 888,4 ppm pada akhir inkubasi. Pengamatan hari ke-21 menunjukkan bahwa naftalen dalam media yang berkadar awal sebesar 907 dan 1362 ppm sudah tidak terdeteksi, sedangkan dalam medium yang berkadar awal sebesar 1813 ppm masih terdapat sisa naftalen sebesar 647 ppm. Sampai dengan pengamatan hari ke-28 dalam media tersebut masih terdapat sisa naftalen sebesar 306,3 ppm. Perbedaan kadar naftalen sisa pada masing-masing media bukan disebabkan oleh perbedaan kecepatan perombakan, tetapi karena jumlah naftalen awal yang berbeda.

Media yang mengandung naftalen dengan kadar awal sebesar 907 ppm pada setiap pengamatan menunjukkan nilai naftalen sisa yang paling rendah dibandingkan dengan kedua media lainnya. Hal ini karena jumlah naftalen yang ditambahkan juga paling rendah. Begitu pula sebaliknya pada media yang mengandung



Gambar 2. Perombakan naftalen dalam MM cair dengan kadar naftalen awal sebesar 907 ppm (♦), 1362 ppm (●), dan 1813 ppm (■) oleh Isolat *Pseudomonas* NY-1, dan pada medium kontrol 907 ppm (◊), 1362 ppm (○), dan 1813 ppm (—).

naftalen dengan kadar awal sebesar 1813 ppm. Perombakan naftalen pada kadar awal yang berbeda oleh Isolat NY-1 menunjukkan pola yang mirip. Kemiripan pola perombakan ini menunjukkan bahwa isolat *Pseudomonas* NY-1 hanya dapat menggunakan naftalen dalam bentuk terlarut. Jumlah naftalen terlarut pada ketiga media relatif sama, sedangkan naftalen yang ditambahkan pada masing-masing kultur jauh di atas nilai kelarutannya dalam air, yaitu sebesar 30,6 ppm. Thomas *et al.* (1986), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa penambahan substrat padat pada kultur jenuh tidak akan mempengaruhi kecepatan perombakan yang berarti. Meskipun demikian, selama inkubasi berlangsung, kenaikan kelarutan naftalen dapat terjadi sebagai akibat dari penggojogan atau surfaktan yang dihasilkan oleh bakteri. Bakteri yang ditumbuhkan pada substrat hidrofobik biasanya akan menghasilkan surfaktan. *Pseudomonas* diketahui dapat menghasilkan surfaktan dari kelompok rhamnolipid (Willumsen & Karlson, 1977).

Smith *et al.* (1997), dalam penelitiannya menggunakan empat isolat bakteri mendapatkan bahwa keempat isolat pada medium mineral cair yang mengandung 500 ppm naftalen yang ditambah dengan ekstrak khamir dan pepton serta jumlah inokulum yang tinggi (10^8 sel/ml), tumbuh secara *sigmoid*, dan naftalen terombak seluruhnya dalam waktu 0,7 hari. Peneliti lain (Bauer & Capone, 1988) mendapatkan isolat bakteri yang dapat memineralisasi sekitar 40% dari 100 ppm naftalen dalam waktu 7 hari, sedangkan Frederickson *et al.* (1991), menunjukkan bahwa isolat bakteri yang digunakannya dapat merombak sebanyak 30% dari 2000 ppm naftalen, selama 7 hari. Hasil penelitian Smith *et al.* tersebut berbeda dengan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini. Perbedaan ini dapat terjadi karena dalam penelitian mereka jumlah naftalen yang ditambahkan lebih sedikit, jumlah inokulum yang digunakan lebih banyak serta jenis medium lebih kompleks dari pada yang digunakan dalam penelitian ini.

Pada media dengan kadar naftalen awal 1813 ppm, setelah inkubasi 8 hari, meskipun masih terdapat naftalen, tetapi naftalen tidak dirombak lebih lanjut. Ada kemungkinan bahwa hal ini terjadi karena selama metabolisme naftalen dihasilkan senyawa yang menghambat perombakan naftalen. Dalam lintasan metabolisme naftalen salah satu hasil antaranya adalah senyawa fenolik berupa dihidroksi naftalen dan katekol (Grim dan Hawood, 1997; Sutherland *et al.*, 1995). Pada umumnya, senyawa fenolik bersifat reaktif sehingga justru bersifat menghambat metabolisme sel. Kemungkinan lain adalah pada kadar naftalen yang tinggi komposisi nutrisi (perbandingan C:N:P) media menjadi tidak seimbang. Senyawa hidrokarbon sangat kaya akan C, tetapi tidak mengandung makro lain seperti N dan P yang dibutuhkan mikroorganisme

2. Pertumbuhan sel isolat *Pseudomonas* NY-1 dalam MM cair

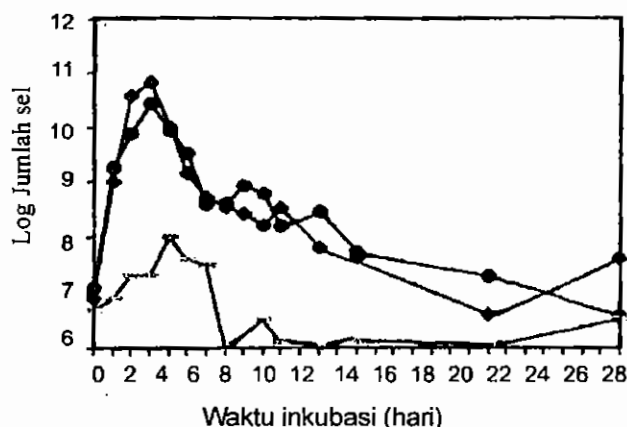
Pertumbuhan bakteri yang menyertai perubahan kadar naftalen di dalam media cair dapat dilihat pada gambar 5. Pertumbuhan isolat *Pseudomonas* NY-1 dalam medium yang mengandung naftalen dengan kadar awal sebesar 907 dan 1362 ppm berbentuk logaritmik sampai pada pengamatan hari ketiga, kemudian mengalami penurunan. Jumlah sel maksimum yang dicapai pada media di atas berturut turut sebesar $6,9 \times 10^{10}$ sel/ml dan $2,6 \times 10^{10}$ sel/ml. Isolat *Pseudomonas* NY-1 pada media yang mengandung naftalen dengan kadar awal 1813 ppm menunjukkan pola pertumbuhan yang berbeda. Jumlah sel maksimum tercapai pada hari kelima, yaitu sebesar 1×10^8 sel/ml. Hasil penghitungan menunjukkan bahwa kecepatan pertumbuhan spesifik isolat *Pseudomonas* NY-1, yang ditumbuhkan dalam media yang mengandung naftalen dengan kadar awal sebesar 907, 1362, dan 1813 ppm, berturut-turut adalah $0,19 \text{ jam}^{-1}$, $0,17 \text{ jam}^{-1}$ dan $0,03 \text{ jam}^{-1}$.

Isolat *Pseudomonas* NY-1 dalam medium yang mengandung naftalen dengan kadar awal sebesar 1813 ppm mempunyai kecepatan pertumbuhan yang rendah. Namun, penurunan kadar naftalen pada media relatif tinggi. Selama inkubasi 28 hari terjadi penurunan kadar naftalen pada media dari 1725,6 ppm pada awal inkubasi menjadi 306,3 ppm pada akhir inkubasi. Ada kemungkinan bahwa konsentrasi naftalen yang tinggi menyebabkan perombakannya menjadi tidak sempurna. Secara kuantitatif jumlah naftalen yang terombak banyak, tetapi secara kualitatif tidak diketahui perombakan yang terjadi sampai pada tahap yang mana. Pada perombakan yang tidak sempurna jumlah energi dan metabolit yang dihasilkan tidak mencukupi untuk pertumbuhan sel, bahkan akan terjadi akumulasi senyawa metabolit tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri bersangkutan.

Pertumbuhan sel isolat bakteri pada media dengan kadar naftalen awal 907 dan 1362 ppm yang tinggi terjadi sampai hari ke-3, dan pada media dengan kadar naftalen awal 1813 ppm terjadi sampai hari ke-4, tetapi kecepatan perombakan naftalen tetap tinggi sampai hari ke-8. Penelitian yang dilakukan oleh Kellog *et al.* (Cit. Atlas & Bartha, 1993), menggunakan

P. cepacia untuk merombak 2,4,5-T menunjukkan pola yang sama. Meskipun jumlah sel sudah mengalami penurunan, tetapi perombakan senyawa persisten tersebut masih berlangsung. Hal ini mungkin karena terjadi akumulasi dioksigenase naftalen atau surfaktan yang bersifat ekstraseluler. Kappeli dan Finnerly (Cit. Miller, 1995) menunjukkan bahwa *Acinetobacter* spp. yang ditumbuhkan pada hidrokarbon akan menghasilkan surfaktan secara ekstraseluler. *Pseudomonas* sp. diketahui pula dapat menghasilkan surfaktan dari kelompok rhamnolipids.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Pseudomonas* NY-1 tidak dapat menggunakan naftalen dalam bentuk tidak terlarut. Dengan demikian, untuk melakukan bioremediasi lingkungan yang tercemari HAP dengan kadar yang tinggi, aplikasi/inokulasi bakteri tersebut harus dibarengi dengan perlakuan lain, seperti pengambilan kontaminan secara fisik atau pengenceran untuk mengurangi kadarnya. Meskipun *Pseudomonas* NY-1 dapat merombak naftalen murni, tetapi untuk mengaplikasikannya ke dalam skala yang lebih luas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Hal ini mengingat bahwa senyawa naftalen sebagai kontaminan di alam biasanya terdapat dalam



Gambar 3. Pertumbuhan sel isolat *Pseudomonas* NY-1 dalam MM cair dengan kadar naftalen awal sebesar 907 ppm (◆), 1362 ppm (●), dan 1813 ppm (-)

bentuk campuran dengan senyawa HAP lain-nya. Karena terdapat interaksi antar-substrat dalam perombakan senyawa HAP campuran, maka pengujian kemampuan isolat *Pseudomonas* NY-1 dalam menggunakan senyawa HAP selain naftalen perlu dikembangkan. Beberapa peneliti menunjukkan bahwa ada kecenderungan suatu galur bakteri dapat merombak lebih dari satu jenis senyawa HAP. Hal tersebut didukung oleh hasil pengamatan yang menunjukkan bahwa pada umumnya jalur perombakan senyawa HAP menghasilkan senyawa antara yang mempunyai struktur mirip, serta dihasilkannya senyawa antara utama berupa asam salisilat dan katekol.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini ialah: isolat bakteri yang dipilih berasal dari unit pengolahan minyak Pertamina, Cilacap, teridentifikasi sebagai *Pseudomonas* NY-1, mampu merombak naftalen dalam media cair. Perombakan naftalen pada media cair dengan kadar naftalen awal yang tinggi dan bervariasi menunjukkan kecepatan yang mirip.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr Ir Siti Syamsiah dan Dr Ir Irfan Dwidya Prijambada yang telah memberi saran. Dana penelitian ini sebagian diperoleh dari Lembaga Penelitian UPN "Veteran" Yogyakarta

DAFTAR PUSTAKA

Ahn, Y; Sansaverano, J. & G.S Sayler. 1999. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Contaminated Soil. *Biodegradation*. 10:149-157.

- Bauer, J.E. & D. G Capone. 1988. Effect of Co-Occuring Aromatic Hydrocarbons on Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Marine Sediment Slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1649-1655.
- Bossert, I.D. & G.C Compeau. 1995. "Cleanup of Petroleum Hydrocarbon Contamination in Soil", dalam: *Microbiol Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. L.Y Young & C.E Cerniglia (eds.). Willey-Liss, New York (hal: 77-121).
- Fought, J.M. & D.W.S Westlake. 1991. Cross Hybridization of Plasmid and Genomic DNA from Aromatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria. *Can. J. Microbiol.* 37:924-932.
- Frederickson, J.K., F.J Brockman, D.J Workman, S.W Li & T.O Stevens. 1991. Isolation and Characterization of Subsurface Bacterium Capable of Growth on Toluene, Naphthalene, and Other Aromatic Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:796-803.
- Grim, A. C. & C. S. Harwood. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. To the polyaromatic hydrocarbon Naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4111-4115.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J. P., and Cerniglia, C. E. 1987. Naphthalene Bio-degradation in Environmental Microcosms Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:129-139.
- Heitkamp, M.A. & C.E. Cerniglia. 1988. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterium Isolated from Sediment Below on Oil Field. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1612-1614.
- Hoben, H.J. & P. Somasegaran. 1982. Comparison of Pour, Spread and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. In Inoculants Made from Presterilized Peat. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1246-1247.

- Kastner, M. & B. Mahro. 1996. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Affected by the Organic Matrix of Compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:668-675.
- Kilbane II, J.J. 1998. Extractability and Subsequent Biodegradation of PAHs from Contaminated Soil. *Water, Air and Soil Pollution.* 104:285-304
- Kirchmann, H. & W. Ewnetu. 1998. Biodegradation of Petroleum-Based Oil Wastes through Composting. *Biodegradation.* 9:151-156
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.). 1982. *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I.* Williams & Wilkens, London (140-307).
- Meyer, S. & S. Hans. 2001. Fate of PAHs and Hetero-PAHs during Biodegradation in a model Soil/Compost-System: Formation of Extractable metabolites. *Water, Air and Soil Pollution.* 132:215-231
- Mueller, J.G., C.E. Cerniglia. & P.H. Pritchard. 1996. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Dalam: Crawford, R.L. and Crawford, D. L. (eds.). *Bioremediation : Principles and Applications.* Cambridge University Press, Idaho. (hal. 125-128).
- Mueller, J.G., Capman, P.J. and Pritchard, P.H. 1989. Action of a Fluoranthene-utilizing Bacterial Community on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components of Creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3085-3090.
- Murygina, V.; Arinbasarov, M.; Kalyuzhnyi, S. 2000. Bioremediation of Oil Polluted Aquatic System and Soil with Novel Preparation "Rhoder". *Biodegradation.* 11:385-389
- Novak, J.M., K. Jayachandran, T.B. Moorman & J.B. Weber. 1995. Sorption and Binding of Organic Compounds in Soils and Their Relation to Bioavailability. Dalam: Skipper, H.D., and Turco, R.F. (eds.). *Bioremediation: Science and Applications.* Soil Science Society of America, Inc., USA (hal. 13-31).
- Pirt, S.J. 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford (hal. 4-14).
- Rosenberg, E. & Ron, E.Z. 1996. "Bioremediation of Petroleum Contamination" dalam: *Bioremediation : Principles and Applications.* R.L. Crawford, & D. L. Crawford. (eds.). Cambridge University Press, Idaho (hal. 100-123).
- Sanseverano, J., B.M. Applegate, J.M King & G.S. Sayler. 1993. Plasmid-mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene, and Anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1931-1937.
- Smith, M.J., G. Lethbridge & R.G. Burns. 1997. Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. *FEMS Microbiol. Letters.* 152:141-147.
- Stringfellow, W.T. & M.D. Aitken. 1995. Competitive Metabolism of Naphthalene, Methyl-naphthalenes, and Fluorene by Phenanthrene-degrading Pseudo-monads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:357-362.
- Thomas, J. M., J. R. Yordy, J. A. Amador, J. A. Amador, & M. Alexander. 1986. Rates of Dissolution and biodegradation of water-Insoluble Organic Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:290-296
- Tiehm, A. & C. Fritzcshe. 1995. Utilization of Solubilized and Crystalline mixture of polycyclic aromatic Hidrocarbons by a Mycobanterium sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:964-968
- Volkering, F., A. M. Breure, A. Sterkerburg, & J. G. van Andel. 1992. Microbial Degradation of Polycyclic hydrocarbons: Effect of Substrat Availability on Bacterial Growth Kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:548-552.
- Whyte, L.G., L. Bourbonniere & L.W. Greer. 1997. Biodegradation of Petroleum

- Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Posses-sing Both Alkane (*alk*) and Naphthalene (*nah*) Catabolic Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2719-2723.
- William, P.A. & J.R. Sayers. 1994. The Evolution of Pathway for Aromatic Hydrocarbon Oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*. 5:195-217.
- Willumsen, P.A. & U. Karlson. 1992. Screening of Bacteria, Isolated from PAH-Contaminated Soil for Production of Biosurfactan and Bioemulsifiers. *Biodegradation* 17:415-423
- Zilber, I. K., E. Rosenberg & D. Gutnick. 1980. Incorporation of ^{32}P and Growth of pseudomonad UP-2 on n-tetracosane. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:1086-1093.